Clinica medica militarizzata della R. Università di Torino
diretta dal Prof. Sen. C. BOZZOLO
(Consulente medico del I° Corpo di Armata)

Saggi di vaccinazione anticolerica

Nota dei
Prof. F. MICHELI - maggiore medico-assimilato
e Prof. dott. G. QUARELLI - capitano medico-assimilato

MILANO
Tipografia ENRICO ZERBONI
Via Cappuccini, 18

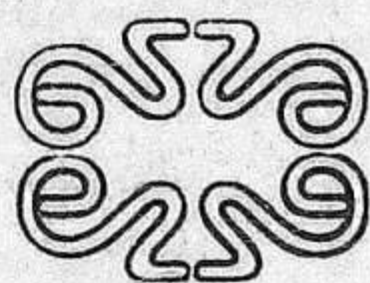
—

Clinica medica militarizzata della R. Università di Torino
diretta dal Prof. Sen. C. BOZZOLO
(Consulente medico del I° Corpo di Armata)

Saggi di vaccinazione anticolerica

Nota dei
Prof. F. MICHELI - maggiore medico-assimilato
e Prof. dott. G. QUARELLI - capitano medico-assimilato

MILANO
Tipografia ENRICO ZERBONI
Via Cappuccini, 18

—

La segnalazione ufficiale del colera in Austria e in Germania ha indotto le nostre supreme Autorità sanitarie civili e militari a mettere in opera, con lodevole sollecitudine, i varî congegni che valgono alla profilassi del terribile morbo.

E fra questi in prima linea, la vaccinazione preventiva anticolerica, che un recentissimo Decreto Luogotenenziale ha reso, molto opportunamente, obbligatoria pei nostri soldati.

Certo, essa rappresenta, in tempo di guerra, il più facilmente applicabile fra i mezzi di protezione, nei riguardi, specialmente, di forti masse di truppe, non accessibili, per ragioni ovvie, alle altre misure profilattiche, che d'ordinario sono sufficienti, in tempo di pace, ad impedire o ad arrestare la diffusione di epidemie.

E, con ogni probabilità, anche il mezzo più efficace.

Il fondamento dottrinale e sperimentale della vaccinazione anticolerica si presenta difatti assai saldo e promettente e quello, ben più importante, che deriva dalle documentazioni statistiche, dal criterio epidemiologico, può dirsi fin d'ora assicurato, attraverso alle molteplici prove eseguite da varie parti nelle colonie di vari Stati e in specie nelle Indie (M. Haffkine), nel Giappone (Murata), in Persia e in Russia da medici tedeschi e russi (Zlatogoroff), in Grecia (Savas e Monoussos), durante la seconda guerra balcanica, e più recentemente ancora, in questi ultimi tempi, in Austria-Ungheria, ove le vaccinazioni anticoleriche, applicate prontamente alle armate combattenti in Galizia, pare abbiano spiegato un'indub-

bia efficacia contro l'incombente e minacciosa epidemia, colà manifestatasi.

Tutte queste prove — per quanto non abbiano assunto la larga estensione delle vaccinazioni preventive antitifiche — hanno cioè dimostrato in maniera concorde una sensibilissima diminuzione di morbilità e mortalità nei vaccinati — specie se vaccinati con due o più iniezioni — in confronto dei non vaccinati e giustificano perciò l'applicazione su più larga scala delle vaccinazioni preventive anticoleriche.

***

I vaccini non mancano : sono anzi così numerosi che può riuscirne imbarazzante la scelta. Come materiale vaccinogeno sono stati adoperati, anche in questo campo, i più varî tipi di vaccino, dalle sospensioni di vibrioni vivi (Ferran, Haffkine) agli estratti batterici alla Neisser-Shiga e ai nucleoproteidi preparati col metodo di Lustig-Galeotti, dalle sospensioni di vibrioni uccisi in vario modo (calore, etere, acido fenico) ai vibrioni sensibilizzati secondo Besredka.

Ma sempre o quasi sempre, per quanto noi sappiamo, la somministrazione del vaccino è avvenuta per via sottocutanea.

L'incontestata superiorità del metodo endovenoso nella pratica dell'immunizzazione sperimentale ci ha indotto a ricercare se e con quali modalità la vaccinazione anticolerica per via endovenosa potesse essere applicata utilmente anche nell'uomo.

E da oltre due mesi gli studi, già iniziati altrove da uno di noi, sono stati ripresi, mercè il gentile consenso ed il vivo interessamento del Senatore prof. Bozzolo, nella Clinica medica militarizzata di Torino, ove varî tipi di vaccino anticolerico sono stati saggiati comparativamente, per via sottocutanea e per via endovenosa, nelle loro manifestazioni generali e locali e nel loro potere vaccinogeno.

Riassumendo brevemente i risultati raccolti fin qui, ci lusinghiamo che essi possano rivestire un qualche interesse, anche perchè assai scarse sono finora le osservazioni biologiche sulla vaccinazione preventiva anticolerica nell'uomo.

Diremo subito che, dopo varî tentativi in vario senso, il vaccino più adatto all'applicazione endovenosa ci è parso il vaccino secco, preparato secondo il metodo generale di Loeffler, come quello che oltre ad essere assai attivo, meglio degli altri risponde ad altre condizioni fondamentali, quali si richiedono a un prodotto inoculabile nelle vene, di essere cioè esattamente dosabile e di conservare lungamente, quasi indefinitamente inalterata la sua attività, che è per contro assai mutevole nei vaccini costituiti da sospensioni acquose di batterî uccisi in vario modo.

Il metodo di preparazione dei vaccini, secondo Loeffler si fonda, com'è noto, sulle proprietà che i fermenti, il complemento e le sostanze proteiche più delicate posseggono di sopportare senza danno, allo stato assolutamente secco, conservando integre le loro proprietà biologiche ed antigene, temperature assai più elevate di quello che non sopportino le stesse sostanze in soluzione o sospensione acquosa.

Questo metodo è stato già applicato alla vaccinazione antitifica da Friedberger e Moreschi, con risultati brillanti.

Gli autori hanno dimostrato fin dal 1906 che dosi di bacillo del tifo uccise, secondo il metodo di Loeffler, oscillanti intorno all'1 0/00 di ansa normale, inoculate nell'uomo per via endovenosa rappresentano quantitativamente pressochè l'*optimum* dell'antigene necessario alla produzione di agglutinine e di batteriolisine e le ricerche più recenti di Moreschi e di Bosisio hanno confermato e sviluppato questi risultati, mettendo in luce da un lato la relativa innocuità e dall'altro il valore e la prontezza vaccinogena di questo tipo di vaccino, che è stato usato largamente nell'uomo, e con effetti esattamente conformi a quelli di Moreschi, anche da uno di noi e da Sebastiani e Galassi, nell'Istituto di Patologia medica di Siena.

***

Per la preparazione del vaccino alla Loeffler ci siamo serviti di un ceppo di vibrione assai virulento per la cavia, fornito di proprietà morfologiche, biologiche e culturali classiche, cortesemente fornitoci dal prof. Ottolenghi.

E' lo stesso vibrione, di cui l'Ottolenghi ha illustrato recentemente le ottime proprietà immunizzanti e protettive nel coniglio e nella cavia.

Il metodo di preparazione da noi adoperato, che corrisponde del resto assai da vicino a quello ben conosciuto per la preparazione del vaccino antitifico alla Loeffler, è di una estrema semplicità.

In una serie di provette sterili vien distesa sulle pareti, verso l'estremità inferiore, un'ansa normale (1) di patina batterica, prelevata da una cultura in agar di 18-20 ore. Le provette chiuse con tappi di cotone sono mantenute per 12-20 ore in un essiccatore ad acido solforico, in cui si fa di quando in quanto il vuoto, sino ad essiccamento completo, sino cioè che l'ansata di bacilli non è ridotta ad una scaglietta chiara e trasparente, che si stacca in qualche parte dalle pareti della provetta. Una volta che il vaccino è ben essiccato, esso viene sterilizzato a secco mantenendo le provette per 2 ore a 108-110°.

Nuovo essiccamento nell'essiccatore e chiusura dei tubetti alla lampada.

Al momento dell'uso, si versa nella provetta contenente il vaccino 1/2 cc. di soluzione fisiologica sterile e strisciando sulla parete coll'ansa di platino, si rompe la scaglietta e la si emulsiona finemente, ciò che riesce assai facile quando il vaccino è ben preparato. Ottenuta una emulsione omogenea si aggiungono ancora 9,5 cc. di soluzione fisiologica sterile. Si ha così una sospensione all'1/10, da cui si procede per ottenere la diluizione, che alla dose di 1 cc. si vuole iniettare nelle vene.

Con questo vaccino sono stati inoculati nelle vene vari soggetti (in parte soldati della clinica, in parte degenti in altri istituti ospitalieri, anche civili) convalescenti di affezioni leggiere non febbrili o affetti da lievi disturbi funzionali, procedendo con ogni cautela, da dosi estremamente piccole (da 1/1000 di ansa) a dosi gradatamente più forti.

---

(1) Il contenuto secco e riscaldato a 110° della nostra ansa corrisponde in peso a mmgr. uno (media di cinque pesate).

Ogni individuo, è stato sottoposto ad una sola iniezione endovenosa e per ognuno si è tenuto conto delle manifestazioni generali indotte dalla vaccinazione e del potere agglutinante assunto dal siero di sangue in IX giornata dall'iniezione (metodo macroscopico di Kolle).

Il potere agglutinante dovrebbe esprimere il potere vaccinogeno del vaccino, per quanto naturalmente, in maniera soltanto indiretta e relativa, dato il non sempre costante parallelismo fra agglutinine e batteriolisine ed altri anticorpi, cui è legata realmente l'azione protettiva delle vaccinazioni.

Parallelamente e comparativamente altri soggetti sono stati sottoposti alla vaccinazione sottocutanea con varî tipi di vaccino, di cui due preparati (Ottolenghi) con lo stesso ceppo di vibrione che ha servito alla preparazione del vaccino secco alla Loeffler e un terzo cortesemente fornitoci dall'Istituto Sieroterapico Vaccinogeno Toscano (prof. Sclavo).

Quest'ultimo vaccino è una sospensione in soluzione fisiologica fenicata al 0,5 % di varî ceppi di vibrioni colerici, uccisi col riscaldamento a 58-60° secondo il metodo di Kolle.

Al tipo Kolle, che rappresenta il tipo di vaccino più largamente usato fin qui nella pratica delle vaccinazioni anticoleriche, corrisponde anche uno dei vaccini preparati col ceppo Ottolenghi. L'altro è stato preparato col metodo di Vincent (sospensione in soluzione fisiologica di vibrioni uccisi coll'etere liquido, evaporando successivamente l'etere), un metodo che da qualche tempo ha trovato una larga diffusione nel campo delle vaccinazioni antitifiche.

Ogni cc. di questi varî vaccini corrisponde a circa un miliardo di vibrioni e di 1 cc. è sempre stata la dose di vaccino inoculata sottocute, sia per iniezione unica, sia per iniezione doppia o più raramente tripla (6-7 giorni di intervallo). Anche nei soggetti così trattati il potere agglutinante è stato determinato nel siero tolto in IX giornata dall'iniezione unica o dall'ultima iniezione.

I risultati raccolti sono condensati per brevità in due tabelle.

Vaccinazioni sottocutanee.

Indicazioni personali	Qualità di vaccino	Numero delle iniezioni	Titolo agglutinante (1) in IX giornata
G. Giovanni	tipo Kolle	1	1 : 40+
A. Alfredo	» »	1	1 : 80+
I. Artemio	» »	2	1 : 400+
V. Ernesto	» »	2	1 : 100+ +
F. Guglielmo	tipo Vincent	1	1 : 20+
M. Giovanni	» »	1	1 : 100+
M. Arturo	» »	2	1 : 400+
P. Luigi	» »	2	1 : 100+
O. Andrea	» »	2	1 : 50+
T. Ottorino	» »	3	1 : 200+
C. Vittorio	Sclavo	1	1 : 100+
S. Vitale	»	1	1 : 50+
A. Gustavo	»	2	1 : 200+
C. Lorenzo	»	2	1 : 400+ +
F. Luigi	»	3	1 : 400+
L. Arturo	»	3	1 : 200+ +

A parità di dosi, il vaccino anticolerico è assai meno tossico, com'è noto, e come risulta nettamente dalla pratica delle iniezioni endovenose, del vaccino antitifico, per modo che le reazioni generali e locali sono abitualmente molto lievi e tali sono apparse nei nostri casi, sia al seguito della prima che delle iniezioni successive. La temperatura cioè non è influenzata o in minimo grado (massimo di 38,2° in un caso) e la reazione locale si riduce ad un po' di dolore, non sempre accompagnato da infiltrazione del tessuto sottocutaneo.

---

(1) + + + = agglutinazione completa.
\+ + = agglutinazione forte.
\+ = agglutinazione parziale.

Vaccinazioni per via endovenosa.

Indicazioni personali	Dosi di vaccino in frazioni di ansa	Temper. massima (rettale)	Titolo agglutinante in IX giornata
B. Marcello	1/100	37.2	1 : 50+
C. Pietro	1/100	37.5	1 : 40+
T. Luigi	1/100	37.8	1 : 100+
De M. Fabio	1/50	37.2	1 : 80+
C. Giovanni	1/50	38.9	1 : 200+
P. Giusepe	1/25	37.5	1 : 400+
T. Giuseppe	1/25	39	1 : 1000+ + +
P. Ottavio	1/25	37.5	1 : 200+
M. Albano	1/25	38.5	1 : 600+
G. Angelo	1/25	38.9	1 : 1000+ +
B. Francesco	1/18	39.8	1 : 600+ +
M. Mario	1/15	38.2	1 : 600+
V. Francesco	1/15	39.1	1 : 400+
T. Francesco	1/15	38.8	1 : 400+
T. Valeriano	1/15	40	1 : 1000+
C. Arturo	1/15	39.1	1 : 600+ +
C. Pietro	1/15	39	1 : 1000+

***

Le tabelle sono così significative che ci dispensano da un largo commento.

Esse dimostrano, con molta evidenza, che all'iniezione endovenosa di vibrioni colerici uccisi col metodo Loeffler spetta una maggiore costanza e regolarità di risultati, in confronto delle iniezioni sottocutanee ripetute per due o tre volte di buoni vaccini, come sono quelli da noi adoperati, fra i quali ottimo sotto tutti gli aspetti quello Sclavo.

E, se è lecito desumere il valore immunizzante di un vaccino dalla produzione di agglutinine di cui è capace — ciò che può farsi senza grave errore, pur colle riserve accennate — il potere vaccinogeno del nostro vaccino introdotto per le vene apparisce non soltanto più regolare e più costante, ma anche decisamente più elevato.

Il fatto non è del resto che l'espressione particolare di una legge generale stabilita dalla scuola di Pfeiffer e in special modo da Mertens e Friedberger, che hanno saputo

mettere in evidenza sperimentalmente le quantità piccolissime di bacilli uccisi, sufficienti ad una produzione considerevole di anticorpi, quando si scelgano, come via di introduzione del vaccino, le vene. Anche qui adunque, come avviene per il tifo e per altri antigeni, l'optimum di azione antigena è esplicato da dosi di vaccino oscillanti entro limiti assai vicini, che nel caso particolare del nostro preparato, ci sembra possano essere fissati tra 1/25 e 1/15 di ansa. Noi abbiamo adoperato difatti in qualche caso dosi alquanto più alte (1/10-1/8), senza ottenere risultati essenzialmente diversi da quelli raccolti con dosi di 1/25-1/15. Dosi superiori devono quindi essere considerate, agli effetti dell'azione antigena, come inutili e capaci soltanto di esagerare — per quanto non in modo sensibile nei nostri casi — l'azione pirogena e tossica del vaccino.

La quantità minima del vaccino anticolerico secco, sufficiente a determinare per via endovenosa una vivace produzione di anticorpi, è certo relativamente lieve, se si confronta colle dosi di vaccino che si iniettano abitualmente sotto cute nella pratica delle comuni vaccinazioni anticoleriche, ma essa apparisce in realtà assai elevata, se si paragona alla dose optimum dell'equivalente vaccino antitifico, che le ricerche concordi di Friedberger e Moreschi, di Moreschi e Bosisio, di Micheli, Sebastiani e Galassi, hanno fissato attorno ad 1/1000 di ansa normale.

Corrispondentemente, assai più debole risulta l'azione tossico-pirogena del nostro vaccino anticolerico, in confronto di quello antitifico preparato colle stesse modalità. Mentre difatti la dose tossico-pirogena minima di vaccino antitifico Loeffler si aggira attorno a 1/2000-1/1000 di ansa normale, nel caso del vaccino anticolerico, essa corrisponde abitualmente, secondo la nostra esperienza, a valori di 1/25-1/15 della nostra ansa. Per queste dosi, la reazione febbrile, individualmente variabile, si è iniziata d'ordinario, nei casi nostri, a 3-6 ore di distanza dall'iniezione endovenosa, per lo più con sensazione di freddo o con brivido; il massimo della temperatura non ha superato di regola i 39° (rettale) e la febbre è caduta pressochè costantemente nello spazio di 24 ore dal suo inizio e talora anche prima, senza strascico di disturbi di sorta. In

rapporto d'ordinario proporzionato all'intensità della reazione termica, i vaccinati hanno presentato un maggiore o minore aumento della frequenza del polso e in misura varia, ma sempre relativamente lieve, i soliti fenomeni generali, (senso di malessere, stanchezza, cefalea, algie vaganti). Nessun disturbo gastro-intestinale.

Con qualche frequenza invece un certo grado di tumefazione della milza, che è rimasta palpabile in due casi per qualche giorno.

Si ripete adunque anche qui il fenomeno acutamente illustrato, nel caso del vaccino antitifico, da Moreschi, che cioè l'optimum dell'azione antigena si identifica quantitativamente colla dose pirogena minima.

Fenomeno biologicamente interessante, che riafferma gli intimi rapporti che intercedono tra azione tossica ed antigena e l'impossibilità di scindere nei vaccini queste due proprietà, mentre costituisce un altro argomento in favore del concetto, già illustrato da uno di noi, che l'azione tossica e vaccinogena di un vaccino rappresentino con ogni probabilità dei fenomeni coordinati ad uno stesso processo fondamentale, la fissazione dell'antigene ai corrispondenti ricettori dell'organismo.

Comunque sia, la individualmente variabile, ma pressochè costante reazione febbrile, che è legata all'introduzione nelle vene dalla dose optimum di vaccino anticolerico, costituisce l'unico inconveniente di questo metodo. Inconveniente peraltro assai lieve e compensato largamente, a parer nostro, dai molteplici vantaggi che l'iniezione endovenosa di vaccino anticolerico secco alla Loeffler presenta in confronto dei processi ordinari di vaccinazione.

Concludendo, questi vantaggi possono riassumersi così:

Possibilità di produzione del vaccino su vasta scala con modestissime modalità di tecnica.

Dosaggio esatto e conservazione indefinita della sua attività.

Maggiore costanza e maggiore regolarità di azione.

Potere vaccinogeno più elevato.

Possibilità di vaccinare con una unica iniezione e, conseguentemente, con notevole risparmio di tempo.

BIBLIOGRAFIA.

Bosisio — Ricerche sperimentali sulla vaccinazione antitifica. - Il Policlinico (M), N. 11, 1913.

Dopter — Prévention du choléra par les vaccins, ecc. - Journ. de Méd. et Chir., p. 169, 1915.

Friedberger e Moreschi — Beitr. z. akt. Immun. des Mensch. gegen Thyphus. - Deut. med. Woch., N. 49, 1906.

Haffkine — Protect. inocul. against Cholera. - Kalkutta, 1913.

Lustig — Il colera asiatico - Malattie inf. dell'uomo e degli animali, Vol. 2, 1915.

Micheli — Ricerche biologiche nei leucemici - Atti della R. Acc. dei Fisiocritici di Siena, 1915.

Moreschi — Funzione antigena e pirogena del bacillo del tifo nei leucemici - Il Policlinico (M), N. 11, 1913.

Ottolenghi — Per la preparazione del vaccino anticolerico - Il Policlinico (S. P.), N. 32, 1915.

Sebastiani e Galassi — Osservazioni e ricerche sull'azione pirog. e antig. esercitata nell'uomo ecc. - Archivio di Farmacologia sperimentale, Vol. 19, 1915.

Zlatogoroff — Die Cholera - Spez. Pth. und Ther. von Kraus und Brugsch, Lief. 40-42, 1914.